

Original document

## METHOD OF STIRRING REACTION LIQUID

Publication number: JP2003248008

Publication date: 2003-09-05

Inventor: TASHIRO HIDEO; KITSUNAI TOKUJI; KONDO  
YASUMITSU; KOIKE TSUTOMU

Applicant: RIKAGAKU KENKYUSHO

Classification:

- international: *G01N33/53; B01F13/00; B01F13/08; C12Q1/68;  
G01N1/36; G01N35/02; G01N37/00; G01N33/53;  
B01F13/00; C12Q1/68; G01N1/36; G01N35/02;  
G01N37/00; (IPC1-7): C12Q1/68; G01N35/02;  
G01N1/36; G01N33/53; G01N37/00*

- european:

Application number: JP20020339344 20021122

Priority number(s): JP20020339344 20021122; JP20010384916 20011218

Also published as:



EP1327473 (A1)

US2003134316 (A

View INPADOC patent family

### Abstract of JP2003248008

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method capable of efficiently stirring a reaction liquid in a minute container.

**SOLUTION:** In the method for stirring the reaction liquid in the minute reaction container, the reaction liquid is stirred by an electromagnetic field change applied to electromagnetic beads included in the reaction liquid from the outside of the reaction container.

**COPYRIGHT:** (C)2003,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2003-248008  
(P2003-248008A)

(43) 公開日 平成15年9月5日(2003.9.5)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	サーチコード(参考)
G 0 1 N 35/02		C 0 1 N 35/02	D 2 G 0 5 2
1/36		33/53	M 2 G 0 5 8
33/53		37/00	1 0 2 4 B 0 6 3
37/00	1 0 2	C 1 2 Q 1/68	A
// C 1 2 Q 1/68		C 0 1 N 1/28	Y
		審査請求 有	請求項の数 6 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2002-339344(P2002-339344)

(22) 出願日 平成14年11月22日(2002. 11. 22)

(31) 優先権主張番号 特願2001-384916(P2001-384916)

(32) 優先日 平成13年12月18日(2001. 12. 18)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(産業再生法第30条の適用を受けるもの)

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72) 発明者 田代 英夫

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
内

(72) 発明者 橘内 徳司

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
内

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス

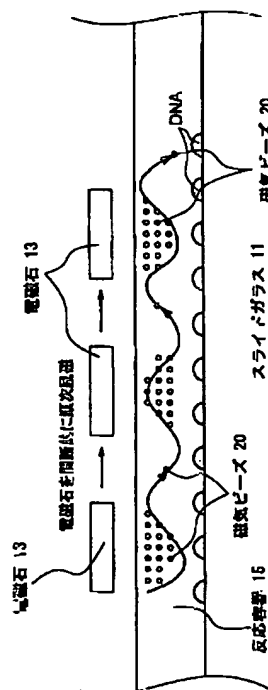
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 反応液の攪拌方法

(57) 【要約】

【課題】微小容器内の反応液を効率よく攪拌できる方法を提供すること。

【解決手段】微小反応容器内の反応液を攪拌する方法であって、前記反応液中に含まれる磁気ビーズに前記反応容器の外部から磁場の変動を与えることで反応液を攪拌する方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】微小反応容器内の反応液を攪拌する方法であって、前記反応液中に含まれる磁気ビーズに前記反応容器の外部から磁場の変動を与えることで反応液を攪拌する方法。

【請求項2】磁場の変動は、反応容器の外部に置かれた複数の電磁石を順次励磁するか、または永久磁石の移動により行う請求項1に記載の方法。

【請求項3】微小反応容器がDNAチップまたはDNAマイクロアレイのハイブリダイゼーション容器である請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】微小反応容器の内部の厚みが0.1mm～1mmの範囲であり、磁気ビーズの直径が前記厚みの0.1～20%の範囲である請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】微小反応容器の容量が10～1000 $\mu$ Lの範囲である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】反応液量の0.1～10容量%の範囲の磁気ビーズを用いる請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、微小反応容器内の反応液を攪拌する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】DNAチップまたはDNAマイクロアレイは、DNAチップまたはDNAマイクロアレイを事業として供給する者もいくつか現れていることから、比較的容易に入手できるようになり、遺伝子診断等の分野においても広く利用されるようになると期待されている。DNAチップまたはDNAマイクロアレイは、スライドガラスあるいはシリコン等の基板上に数千から数万の指標となるDNA（プローブDNA）を高密度に配置したものであり、これを検出すべきDNA（ターゲットDNA）溶液中に浸漬または振りかけてハイブリダイゼーションさせる。ハイブリダイゼーションには、一部自動化装置も出現しているものの、安定性、高価さ等の観点から、依然としてマニュアル（手動）ハイブリダイゼーションが広く行われている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】DNAチップまたはDNAマイクロアレイにターゲットDNAをハイブリダイゼーションさせるためにはターゲットDNAを含む数～数十 $\mu$ LのサンプルをDNAチップまたはDNAマイクロアレイに滴下し、カバーガラスでカバーして数時間置く必要がある。信頼できるハイブリダイゼーションの結果を得るためには、DNAチップまたはDNAマイクロアレイ上のプローブDNAにターゲットDNAがハイブリダイゼーション可能な状態で接近できる必要がある。

しかし、液量が微量であることから、液の攪拌は容易ではなく、無攪拌の場合、ハイブリダイゼーションの完了には18～24時間必要であり、市販の攪拌機能を有するハイブリダイゼーション機器でもハイブリダイゼーションの完了には4時間程度必要である。また、市販の攪拌機能を有するハイブリダイゼーション機器では、100～400 $\mu$ Lのサンプル液量が必要である。さらに、市販の攪拌機能を有するハイブリダイゼーション機器は機構が複雑であることから高価であるという欠点もある。

【0004】また、マニュアルでのハイブリダイゼーションではハイブリダイゼーション不良により再現性良いデータが得られない場合があり、また、ハンドリングする個人によっても、結果にばらつきが生じる、という問題もあった。DNAチップまたはDNAマイクロアレイが益々普及するには、DNAチップまたはDNAマイクロアレイにターゲットDNAをハイブリダイゼーションさせる場合のように、微小容器内の反応液を効率よく攪拌できる方法の出現が望まれていた。

【0005】そこで本発明の目的は、微小容器内の反応液を効率よく攪拌できる方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決する発明は以下の通りである。

【請求項1】微小反応容器内の反応液を攪拌する方法であって、前記反応液中に含まれる磁気ビーズに前記反応容器の外部から磁場の変動を与えることで反応液を攪拌する方法。

【請求項2】磁場の変動は、反応容器の外部に置かれた複数の電磁石を順次励磁するか、または永久磁石の移動により行う請求項1に記載の方法。

【請求項3】微小反応容器がDNAチップまたはDNAマイクロアレイのハイブリダイゼーション容器である請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】微小反応容器の内部の厚みが0.1mm～1mmの範囲であり、磁気ビーズの直径が前記厚みの0.1～20%の範囲である請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】微小反応容器の容量が10～1000 $\mu$ Lの範囲である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】反応液量の0.1～10容量%の範囲の磁気ビーズを用いる請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明は、微小反応容器内の反応液を攪拌する方法であって、反応液に含まれる磁気ビーズに反応容器の外部から磁場の変動を与えることで反応液を攪拌することを特徴とする方法である。本発明において微小反応容器とは、例えば、DNAチップまたは

DNAマイクロアレイのハイブリダイゼーション容器であることができる。但し、微小反応容器は、ハイブリダイゼーション容器に限定されるものではない。微小反応容器は、例えば、容量が10～1000 $\mu$ Lの範囲であることができ、好ましくは、100～300 $\mu$ Lの範囲である。また、ハイブリダイゼーション容器などの場合、微小反応容器は、対向する2枚のプレート（例えば、スライドガラス）とプレートの間のスペーサーとなり、かつプレート間に反応液を封入できるスペーサー部材（例えば、Oリング）からなることができる。この場合、微小反応容器の内部の厚み（即ち、スペーサー部材の厚みに相当する）は、例えば、0.1mm～1mmの範囲であることができる。

【0008】上記微小反応容器を構成する2枚のプレートの少なくとも一方は、その表面にDNAを固定したDNAチップまたはDNAマイクロアレイであることができる。また、反応液は、ターゲットDNAを含有するハイブリダイゼーション溶液であることができる。

【0009】本発明の方法では上記微小反応容器内に反応液と磁気ビーズとを封入し、反応容器の外部から磁場の変動を与えることで反応液を攪拌する。磁気ビーズの直径は、磁気ビーズの流動が容易に起こりかつ反応液の攪拌も効率的に行えるという観点から、上記微小反応容器の厚みの0.1～20%の範囲であることが適当であり、好ましくは1～10%の範囲である。具体的には磁気ビーズの直径は、0.001～0.1mmの範囲であることができる。また、磁気ビーズは直径の揃ったものを使用することも、直径の不揃いのものを意図的に使用することもできる。使用する磁気ビーズの種類は、反応の種類に応じて適宜決定できる。但し、反応液に含まれる成分やプレートに固定化されている成分との意図しない反応を回避するという観点から、磁気ビーズは、表面がそれらの成分と反応しにくい樹脂（例えば、ポリプロピレン）等で処理されたものであることが好ましい。

【0010】また、磁気ビーズの量は、磁気ビーズの流動が容易に起こりかつ反応液の攪拌も効率的に行えるという観点から、反応液量の0.1～20容量%の範囲であることが適当であり、好ましくは1～10容量%の範囲である。

【0011】磁気ビーズを流動させるための磁場の変動は、反応容器の外部に置かれた複数の電磁石を順次励磁するか、または永久磁石の移動により行うことができる。反応容器の外部から磁場の変動を与えることで磁気ビーズを反応液内で移動させ反応液を攪拌する場合を、図1に基づいて説明する。

【0012】図1は、本発明の方法を実施するためのハイブリステーションの概略図である。上図は平面図、下図は側面図である。ハイブリステーション10は、スライドガラス11（例えば、DNAがアレイされたスライドガラス）、スライドガラス11と対向して設けられ、

少なくとも1つの電磁石13が埋設されたカバープレート12、スライドガラス11とカバープレート12との間隔を保つためのスペーサー部材であるOリング14、反応容器15への注入口16、排出口17、サーモモジュール18から構成されている。反応容器15は、スライドガラス11、カバープレート12及びOリング14により構成され、その範囲は、約20mm×60mm、その厚みは約0.2mmであり、容量は約250 $\mu$ Lである。

【0013】反応容器15に磁気ビーズ20を含む所定量（250 $\mu$ L）反応液が注入口16から注入される。複数の電磁石13は、図1の上図から分かるように、カバープレート12中にスライドガラス11上を周回するように配置（埋設）されている。反応液の注入完了後、複数の電磁石13に順次励磁され、それに伴って、磁気ビーズは、周回する電磁石13に沿って移動する。この反応液中での磁気ビーズの移動（流動）に伴って反応液も回転し、攪拌される。

【0014】この状態を図2に示す。図2では、電磁石13が左から右に順次励磁され、励磁された電磁石に磁気ビーズ20が吸引され、励磁された電磁石がシフトするのに伴って、磁気ビーズ20も左から右に順次移動する。

【0015】図1では、複数の電磁石13を、スライドガラス11上を周回するようにカバープレート12中に配置（埋設）したが、周回するような配置以外に、例えば、スライドガラス11の長手方向の一方の端から他方の端に、直線上に位置するように、カバープレート12中に配置したり、ジグザクに配置したりすることもできる。また、上記例では、磁気ビーズの移動を、電磁石を用いて行ったが、電磁石以外の手段、例えば、永久磁石を利用することもできる。

【0016】磁気ビーズの移動（流動）による反応液の攪拌中、反応液の温度は、反応に適した温度にサーモモジュール18を用いて調整することができる。反応液の温度は、ハイブリダイゼーションの場合、例えば、常温～90℃であることができる。また、反応時間は、反応の種類に応じて適宜決定できる。但し、本発明の方法によれば、微少量の反応液であってもより効率よく攪拌できるので、反応時間を短縮することは可能である。

【0017】反応終了後、反応液は、排出口17から排出され、反応容器内は適宜洗浄及び乾燥される。スライドガラス11が、DNAチップまたはDNAマイクロアレイである場合、スライドガラス11は回収され、ハイブリダイゼーションの検出操作（例えば、ハイブリダイズしたDNAの検出のための蛍光分析等）にまわされる。また、反応液とともに回収された磁気ビーズは、反応液から分離され、洗浄及び乾燥されて、再利用することができる。

【0018】上記図1には、1つの反応容器を示した

が、本発明の方法に使用する装置は、複数の反応容器と反応容器に反応液、洗浄液を供給するためのユニット（反応液タンク、洗浄液タンク、送液パイプ及びポンプ等）並びに廃液及び磁気ビーズ回収のためのユニット（廃液タンク、磁気ビーズ回収タンク、送液パイプ及びポンプ等）を備えた複合装置とすることもできる。図3参照。尚、図3に示す装置は、10個の反応容器15を備える。

【0019】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

プロトコール

1. 下記プローブをスタンプしたスライドガラス（DNAマイクロアレイ）を図1に示すようにハイブリカセットにセットし65℃に加熱した。スライドガラスへのプローブのスタンプは、1つのドットの直径が約100～150μmとなるようにし、かつ1つのスライドガラスに441個のドットを形成した。

## 2. ターゲット

	濃度	攪拌あり	攪拌なし	最終濃度
Cy5-dUTP-gapdh	254ng/μl	1.93	1.93	1.4ng/μl
20×SSC		42.5	52.5	3×SSC
yeast tRNA	10μg/μl	35	35	1μg/μl
10×blocking solution		35	35	1×b. s.
10%SDS		7	7	0.2%SDS
ビーズ in 20×SSC		10	-----	
DW		218.57	218.57	
Total		350μl	350μl	

\*ビーズ in 20×SSC : ビーズ 0.05g + 20×SSC 1000μl

【0022】図4はハイブリダイゼーション時にターゲット溶液をビーズ攪拌した場合としない場合のプローブ強度に対するハイブリッドしたターゲット強度の比を示したものである。ビーズ攪拌をしなかった場合、0.052（比）であったのに対して、ビーズ攪拌をした場合、0.111（比）であった。即ち、cDNAマイクロアレイにおいて磁気ビーズ攪拌法（反応液の攪拌方法）（実施例）を用いることによって、攪拌なし（比較例）でハイブリダイゼーションを行った場合と比較して、ターゲットDNA溶液の濃度が同量であっても、ハイブリダイゼーションを促進する効果（攪拌効果）によって高感度に均一なハイブリットシグナルを得ることができた。

【0023】

【発明の効果】本発明の方法によれば、DNAチップまたはDNAマイクロアレイにターゲットDNAをハイブリダイゼーションさせる場合のように、微小容器内の反応液を効率よく攪拌できる。特に、DNAチップまたはDNAマイクロアレイにターゲットDNAをハイブリダイゼーションさせる方法の場合、安定したハイブリダイゼーションの結果を、より短い時間で得ることができ

2. 加熱後、下記ターゲット溶液（350μl）をスライドガラス上に注入した。

3. その後16時間加熱（ハイブリダイゼーション）した。実施例（攪拌あり）では加熱中、ハイブリカセット上部で永久磁石を往復運動させることにより溶液中の磁気ビーズを移動させ溶液を攪拌した。攪拌速度は5mm/sとした。比較例（攪拌なし）は、永久磁石の往復運動を行わない以外は実施例と同様に行った。

4. 16時間後、スライドガラスを2×SSC、1×SSC、0.2×SSCを用いて順次洗浄した。

5. 公知の方法でスキャナー解析（数値化）した。結果を図4に示す。

【0020】プローブ、ターゲットの成分および濃度

1. プローブ（スタンプ濃度）

Cy3-gapdh in 1×PBS濃度 308 ng/μl

【0021】

【表1】

る。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法を実施するためのハイブリステーションの概略図。

【図2】本発明の方法における磁気ビーズによる攪拌の想像図。

【図3】本発明の方法を実施するための微小容器を複数設けたハイブリステーションの概略図。

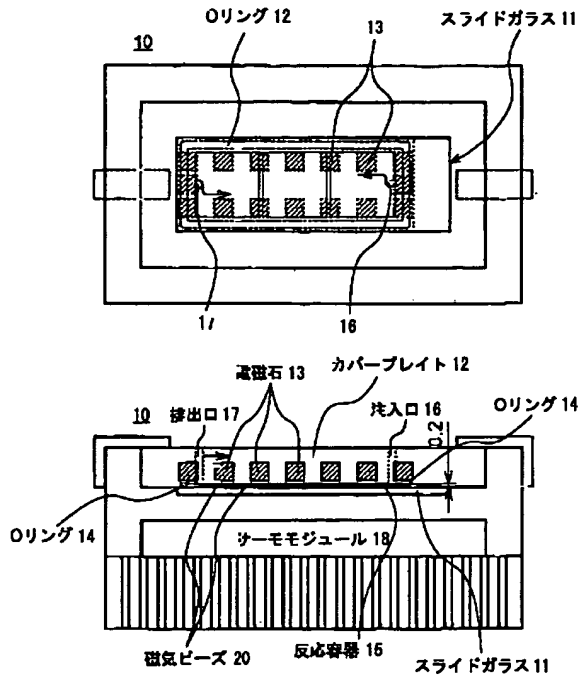
【図4】実施例におけるハイブリダイゼーション実験の結果。

【符号の説明】

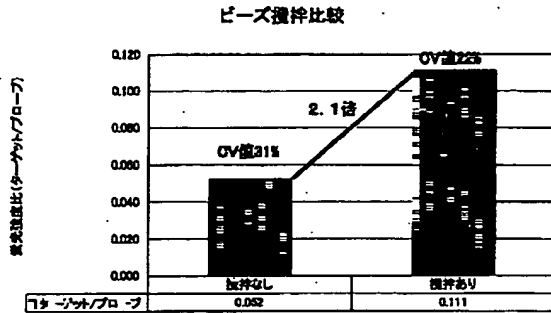
- 10 ハイブリステーション
- 11 スライドガラス11
- 12 カバープレート
- 13 電磁石
- 14 オリング
- 15 反応容器
- 16 注入口
- 17 排出口
- 18 サーモモジュール

20 磁気ビーズ

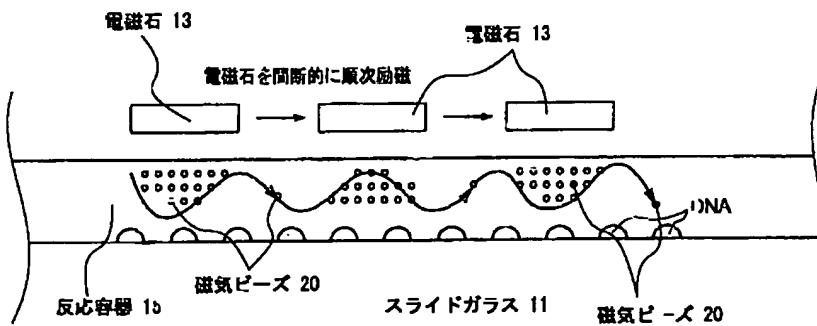
【図1】



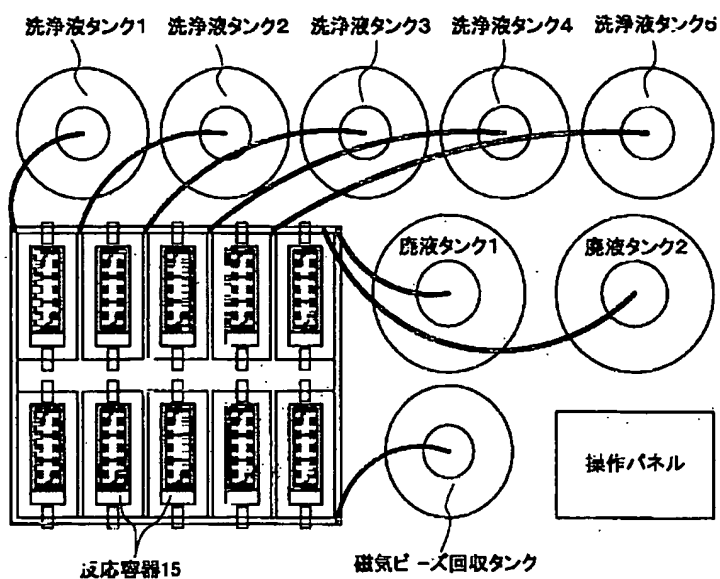
【図4】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 近藤 恭光  
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
内  
(72)発明者 小池 力  
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
内

Fターム(参考) 2G052 AB20 AD26 AD52 CA03 CA12  
DA08 EB12 FB02 FB10 FC06  
FC11 FC15 GA11 JA07  
2G058 BB02 BB09 BB15 CC02 CC09  
CC14 FA02 FB03 FB12 GA02  
4B063 QA01 QA17 QA18 QA19 QQ42  
QQ52 QR32 QR55 QR82 QS34  
QS36 QX01